利用原核表达系统制备家蚕非典型嗅觉受体 Orco 抗原蛋白

尹淑艳[1,#], 杨春红[1,#], 刘朝阳[2], 于 奇[2], 高绘菊[2], 崔为正[2], 刘庆信[2,*]

(1. 山东农业大学植物保护学院, 山东泰安 271018; 2. 山东农业大学林学院, 山东泰安 271018)

摘要:【目的】探索建立一种有效制备昆虫非典型嗅觉受体 Orco 抗原的方法,为 Orco 蛋白组织定位及功能研究奠定基础。【方法】设计带有 *Bam*H I 和 *Hin*d III 酶切位点的引物,采用 RT-PCR 方法扩增家蚕 *Bombyx mori* Orco 第 4-5 跨膜区之间的基因片段,将其与原核表达载体 pET-28a(+)双酶切处理后进行连接,然后转化大肠杆菌 *Escherichia coli* 感受态细胞 DH5α,重组质粒再转化大肠杆菌 BL21(DE3)菌株,用 IPTG 诱导表达,用 SDS-PAGE 检测诱导蛋白,用 HisTrap HP 亲和层析对诱导表达的大量蛋白进行纯化。【结果】在大肠杆菌原核表达系统中,用 IPTG 诱导获得了与预测蛋白大小相符的目的蛋白,经 SDS-PAGE 检测发现目的蛋白以包涵体形式表达,在变性条件下经 HisTrap HP 亲和层析获得大量可用于抗体制备的纯化蛋白。【结论】利用原核表达系统可获得制备家蚕 Orco 抗体的抗原蛋白。

关键词: 家蚕; 原核表达; 非典型嗅觉受体; Orco; 抗原蛋白

中图分类号: Q966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2015)11-1194-07

Preparation of the antigen protein of the atypical olfactory receptor Orco in the silkworm (*Bombyx mori*) with prokaryotic expression system

YIN Shu-Yan[1,#], YANG Chun-Hong[1,#], LIU Zhao-Yang[2], YU Qi[2], GAO Hui-Ju[2], CUI Wei-Zheng[2], LIU Qing-Xin[2,*] (1. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China; 2. College of Forestry, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

Abstract: 【Aim】To establish an effective method to prepare the antigen protein of the atypical insect olfactory receptor Orco, and to provide the foundation for study on the immunolocalization and function of Orco. 【Methods】The target fragment between the 4th - 5th transmembrane regions of *Orco* gene was amplified from the silkworm, *Bombyx mori*, by RT-PCR using primers containing restriction sites of *Bam*H I and *Hin*d III. This target fragment was digested with *Bam*H I and *Hin*d III directly and ligated to the pET-28a (+) expression vector digested with the same two restrictive enzymes. The ligated product was transformed into the competent *Escherichia coli* cell DH5α, and the positive clones were testified by PCR and sequenced. The right recombinant expression plasmids were transformed into BL21 (DE3) strains, which then were induced with IPTG. SDS-PAGE was used to identify the expressed recombinant protein. A large amount of the induced protein was purified by HisTrap HP affinity chromatography. 【Results】The target protein whose size was consistent with the predicted protein was induced in *E. coli* prokaryotic expression system. The target protein was expressed in the form of inclusion body detected by SDS-PAGE. A large amount of purified protein which can be used for antibody preparation was obtained by HisTrap HP affinity chromatography under denaturing conditions. 【Conclusion】The antigen protein used for antibody preparation of silkworm olfactory receptor Orco can be obtained by prokaryotic expression system.

Key words: *Bombyx mori*; prokaryotic expression; atypical olfactory receptor; Orco; antigen protein

---

基金项目: 国家重点基础研究发展计划("973"计划)项目(2012CB114603); 山东科技发展计划项目(2014GNC110001); 现代农业产业技术体系建设专项基金项目(CARS-22-ZJ0302); 山东农业大学博士后基金项目(76364); 山东省现代农业产业技术体系蚕桑产业创新团队建设项目(31892)

作者简介: 尹淑艳, 女, 1973 年 5 月生, 博士, 副教授, 主要从事昆虫化学生态学及分子生物学研究, E-mail: shuyany@163.com; 杨春红, 女, 1989 年 9 月生, 硕士研究生, 从事昆虫分子生物学研究, E-mail: yangchh1989@163.com

[#]共同第一作者 Authors with equal contribution

[*]通讯作者 Corresponding author, E-mail: liuqingxin@sdau.edu.cn

收稿日期 Received: 2014-05-06; 接受日期 Accepted: 2015-08-20

嗅觉在昆虫生命活动中起着非常重要的作用。嗅觉受体是参与昆虫嗅觉识别的一类重要蛋白。目前已发现的嗅觉受体可分为 3 种类型：第 1 种是传统嗅觉受体（olfactory receptor，OR），高度多样化，不同受体间的同源性较低，与气味配体特异性结合，在嗅觉神经元中有选择地表达（Clyne *et al*.，1999；Vosshall *et al*.，1999，2000；Dobritsa *et al*.，2003）；第 2 种嗅觉受体被称为 Orco（odorant receptor co-receptor），在不同昆虫种间高度保守（Hill *et al*.，2002；Krieger *et al*.，2003；Pitts *et al*.，2004；Jones *et al*.，2005；Patch *et al*.，2009；Olafson，2013），本身不与气味配体结合，但与传统嗅觉受体形成复合体 OR-Orco，促进传统嗅觉受体在神经元树突膜上的定位并维持其稳定性，提高传统嗅觉受体对气味反应的效率（Larsson *et al*.，2004；Sakurai *et al*.，2004；Nakagawa *et al*.，2005；Neuhaus *et al*.，2005；Benton *et al*.，2006），在成虫和幼虫的大多数嗅觉神经元中表达（Vosshall *et al*.，1999，2000；Ng *et al*.，2002；Elmore *et al*.，2003；Krieger *et al*.，2003；Larsson *et al*.，2004；Pitts *et al*.，2004）；第 3 种是近几年发现的一类新型嗅觉受体，被称为离子型受体（ionotropic receptor，IR），在既没有普通嗅觉受体也没有味觉受体表达、但对多种不同气味有反应的感觉神经元中表达（Benton *et al*.，2009；Liu *et al*.，2010；Rytz *et al*.，2013）。

研究证实 Orco 在昆虫嗅觉识别过程中发挥关键作用——采用基因突变或 RNAi 等技术使 *Orco* 基因沉默后，昆虫会出现严重的嗅觉缺陷（Larsson *et al*.，2004；Engsontia *et al*.，2008；Zhao *et al*.，2011；Zhou *et al*.，2014）。*Orco* 基因的高度保守性及其表达的广泛性以及在昆虫嗅觉识别中的重要性引起研究者的高度重视，自 21 世纪初期以来对其进行了广泛深入的研究。

分析基因的时空表达谱是了解基因功能的基础。有关 *Orco* 基因表达谱的研究报道很多，但多数是采用半定量 RT-PCR 或实时荧光定量 PCR、原位杂交等方法研究其 RNA 水平上的表达情况，而基于免疫组化技术的蛋白水平上的表达研究较少，目前仅在双翅目昆虫果蝇 *Drosophila*（Larsson *et al*.，2004；Benton *et al*.，2006）、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*（Pitts *et al*.，2004，2014）、埃及伊蚊 *Aedes aegypti*（Melo *et al*.，2004；Pitts *et al*.，2014）、致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus*（Xia and Zwiebel，2006）、厩螫蝇 *Stomoxys calcitrans* 和西方角蝇 *Haematobia irritans*（Olafson，2013），半翅目昆虫温带臭虫 *Cimex lectularius*（Hansen *et al*.，2014）及膜翅目昆虫中华蜜蜂 *Apis cerana cerana*（张林雅等，2012）等少数昆虫中有报道，并且研究中用于制备抗体的抗原均为人工合成的多肽。为了建立一种有效的、普通实验室可行的 Orco 抗原制备方法，为 Orco 蛋白水平上的表达及功能研究奠定基础，本文以家蚕 *Bombyx mori* 为研究材料，探索建立了以原核表达系统制备 Orco 抗原的方法。

1 材料与方法

1.1 供试材料和主要试剂

供试家蚕品种为“广食 1 号”，由山东农业大学蚕学专业选育、保存。家蚕幼虫于 25℃ 恒温培养箱中用桑叶饲养，剪取 5 头 5 龄第 3 天幼虫的头部，用预冷的 1×PBS 冲洗干净，置于 1.5 mL 离心管中，液氮速冻，-80℃ 保存。

动物组织总 RNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒、大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α、pMD19-T 载体等购自天根生化科技（北京）有限公司。BL21（DE3）菌株、原核表达载体 pET-28a（+）由本实验室保存。高保真酶、核酸限制性内切酶、DNA Marker、蛋白质 Marker、反转录试剂盒等购自宝生物工程有限公司。IPTG 等购自美国 Bio Basic Inc. 公司。蛋白质提取试剂盒、化学放光底物、辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 等购自碧云天生物技术研究所。其他试剂购自生工生物有限公司。目的基因引物合成及测序由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

蛋白纯化所用试剂主要有 20 mmol/L Binding Buffer，40 mmol/L Washing Buffer，500 mmol/L Elution Buffer，20 mmol/L Binding Buffer，配制方法同徐欣等（2013）。

1.2 RNA 提取和 cDNA 合成

根据试剂盒说明，取家蚕 5 龄第 3 天幼虫的头部组织 20 mg，提取总 RNA，并用超微量分光光度计检测纯度与浓度。按照反转录试剂盒的说明，取 1 μg 总 RNA 进行反转录得到 cDNA 第一条链，于 -20℃ 保存备用。

1.3 *Orco* 基因原核表达片段的选取及克隆

Pitts 等（2004）根据冈比亚按蚊 *Orco* 基因第 268-281 位氨基酸序列人工合成多肽，以此为抗原制备了冈比亚按蚊 Orco 多克隆抗体。用 TMHMM 程序（http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/）预测冈比亚按蚊 Orco 的跨膜区可知用于合成人工

多肽的氨基酸序列位于 Orco 的第 4 和第 5 跨膜区之间，据此本研究选取家蚕 Orco 第 4 和 5 跨膜区之间最长的胞内环片段（编码区第 227 – 336 位共 110 个氨基酸）作为原核表达片段。根据已注册的家蚕 *Orco* 基因的核苷酸序列，在所选片段的 3′端加上终止子 TAG，设计一对带有 *Hin*d Ⅲ 和 *Bam*H Ⅰ 酶切位点的引物（扩增片段大小为 333 bp），正向引物序列为：5′-CAAGCTTGGATCCTTTGCCTGTGAACAGCTG-3′；反向引物序列为：5′-CAAGCTTAAGCTTCTACCTAACAACGTGCTTAT-3′。

PCR 反应体系为 50 μL 体系，其中含有 10 μL 5 × PrimeSTAR Buffer，4 μL dNTP Mixture，引物（10 μmol/L）各 0.5 μL，cDNA 1 μL，PrimeSTAR HS DNA Polymerase 0.5 μL，ddH_2O 50 μL。

PCR 反应条件为：95℃ 预变性 5 min；98℃ 变性 20 s，54℃ 退火 40 s，72℃ 延伸 30 s，30 个循环；72℃ 延伸 5 min。

扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测，回收目的片段，于 16℃ 金属浴过夜连接至 pMD19-T 载体，连接产物转化到 *E. coli* DH5α 感受态细胞，在含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 固体培养基上进行蓝白斑筛选，随机挑取白斑进行菌液 PCR 鉴定，筛选出阳性克隆，由上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序验证，验证正确的提取重组质粒 pMD19-T-*Orco*，保存备用。

1.4 原核表达载体的构建

利用 *Hin*d Ⅲ 和 *Bam*H Ⅰ 限制性内切酶酶切验证正确的重组质粒 pMD19-T-*Orco* 以及 pET-28a（+）载体，酶切产物经琼脂糖凝胶回收后于 16℃ 金属浴过夜连接，连接产物转化至 *E. coli* DH5α 感受态细胞，挑选阳性克隆，测序鉴定，提取重组质粒 pET-28a（+）-*Orco*。

1.5 Orco 蛋白的诱导表达

将测序验证正确的重组质粒 pET-28a（+）-*Orco* 转化至大肠杆菌菌株 BL21（DE3）中进行诱导表达（小量表达），用 SDS-PAGE 检测诱导蛋白的表达形式后再进行大量诱导表达，具体方法参照徐欣等（2013），用 ExPASy（http://web.expasy.org/compute_pi/）预测重组蛋白的分子量。

1.6 包涵体蛋白的变性纯化

大量诱导结束后，离心弃上清，沉淀用 20 mmol/L Binding Buffer 重悬，超声处理，重复两次，离心后取沉淀用含 6 mol/L 盐酸胍的 20 mmol/L Binding Buffer 重悬，短暂离心，于冰上静置 1 h，离心后取上清过 0.22 μm 的滤膜，用于纯化。

纯化前，HisTrap HP 亲和层析柱先用 5 mL 不含盐酸胍的 500 mmol/L Elution Buffer 平衡，再用 10 mL 含 6 mol/L 盐酸胍的 20 mmol/L Binding Buffer 平衡，上样后，用 15 mL 含 6 mol/L 盐酸胍的 40 mmol/L Binding Buffer 洗脱，去除杂蛋白，最后用 10 mL 含 6 mol/L 盐酸胍的 500 mmol/L Elution Buffer 洗脱重组蛋白，每 1 mL 收集一管。

1.7 家蚕 Orco 抗体制备和 Western blot 检测及抗体染色

抗体制备：将纯化后的重组蛋白作为抗原提供给京天成生物技术（北京）有限公司制备小鼠多克隆抗体。ELISA 检测抗体效价：取小鼠尾血作为一抗，进行倍比稀释。用原核表达的重组蛋白作为抗原，每孔加入 100 ng。二抗为山羊抗小鼠 IgG。用含 5% 脱脂奶粉的 PBS 缓冲液代替一抗作为对照。

家蚕总蛋白提取：采用碧云天蛋白提取试剂盒，取 20 头家蚕 3 龄第 1 天幼虫头部，加含 1 mmol/L PMSF 的蛋白提取液，充分研磨，4℃ 离心取上清，加 SDS-PAGE 上样缓冲液 95℃ 变性备用。

Western blot：重组蛋白以及家蚕总蛋白经 SDS-PAGE 电泳后，经电转移法将凝胶上的蛋白转移到 PVDF 膜上，用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温下封闭 2 h，以制备的小鼠多克隆抗体稀释 5 000 倍为一抗，室温孵育 2 h，用 TBST 洗涤 3 次，然后用辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 稀释 25 000 倍为二抗，室温孵育 1 h，用 TBST 洗涤 3 次。加化学发光剂于膜表面，显色 5 min，于放有 X 光片的暗匣中曝光 2 min，然后将 X 光片置于显影液中显色，5 min 后用水冲洗 X 光片，再将 X 光片在定影液中放置 10 min 后，用水冲洗 X 光片，室温下晾干，拍照记录结果。

抗体染色：方法参照 Yu 等（2014），Orco 抗体浓度为 1∶500。

2 结果

2.1 *Orco* 基因片段的克隆

以家蚕 5 龄幼虫头部总 RNA 反转录得到的 cDNA 为模版进行 PCR 扩增，扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测，在约 300 bp 处出现特异性扩增条带（图 1）。扩增产物切胶回收纯化后与载体 pMD19-T 连接得重组质粒 pMD19-T-*Orco*，将重组质粒转化到 *E. coli* DH5α 感受态细胞中，挑选阳性克隆经 PCR 鉴定和测序证明得到正确的重组质粒 pMD19-T-*Orco*。

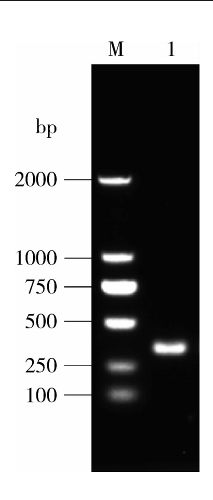


图 1　家蚕 5 龄幼虫头部 *Orco* 基因片段的 PCR 扩增产物

Fig. 1　PCR product of the *Orco* gene in the 5th instar larvae of *Bombyx mori*

M：DNA 分子量标准物 Molecular weight marker DL2000；1：*Orco*.

2.2　原核表达载体的构建

将 pET-28a(+)载体以及重组质粒 pMD19-T-*Orco* 用 *Hin*d Ⅲ 和 *Bam*H Ⅰ 限制性内切酶进行酶切，酶切产物连接(图 2：A)、转化至 *E. coli* DH5α，用 pET-28a(+)载体引物进行菌液 PCR 检测(图 2：B)，筛选阳性克隆，测序鉴定。测序结果与 2.1 节得到的基因片段一致，表明 *Orco* 已正确插入 pET-28a(+)载体中，得到正确的重组质粒 pET-28a(+)-*Orco*。

2.3　Orco 蛋白的诱导表达及变性纯化

将测序验证正确的重组质粒 pET-28a(+)-*Orco* 导入 *E. coli* BL21(DE3)，经 1.0 mmol/L IPTG 37℃ 诱导培养 6 h 后，用 SDS-PAGE 电泳检测所表达的蛋白。结果表明，诱导组与未加 IPTG 诱导相比，产生了约 15 kDa 的蛋白，与预测蛋白大小一致，超声处理后发现诱导蛋白存在于沉淀中(图 3)，说明目的蛋白以包涵体形式表达。

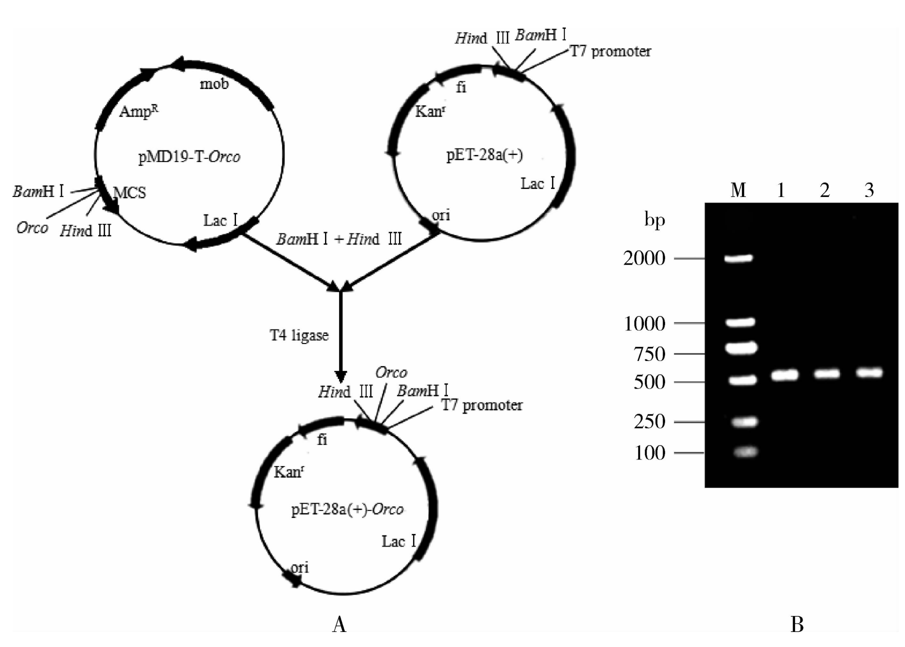


图 2　重组质粒 pET-28a(+)-*Orco* 的构建(A)及菌液 PCR 检测(B)

Fig. 2　Sketch of construction of the prokaryotic expression vector pET-28a(+)-*Orco* (A) and the detection of PCR products (B)

M：DNA 分子量标准物 DNA molecular weight marker DL2000；1-3：重组质粒 pET-28a(+)-*Orco* Recombinant plasmid pET-28a(+)-*Orco*.

大量诱导表达时在加入 2% 葡萄糖的 LB 培养基中培养，收集菌体，再大量培养，加入 IPTG 诱导表达6 h，菌液经 3 次超声处理，盐酸胍变性后，发现重组蛋白存在于上清液中，表明得到可溶的重组蛋白。将可溶的重组蛋白过柱纯化，收集的目的蛋白洗脱液经 SDS-PAGE 电泳检测发现目的蛋白主要存在于前 3 管(图 3)。

2.4　家蚕 Orco 抗体制备和 Western blot 检测及抗体染色

将纯化后的重组蛋白作为抗原提供给京天成生物技术(北京)有限公司制备了小鼠多克隆抗体，ELISA 效价检测结果显示抗体血清针对抗原的滴度 ≥1∶50 000(图 4)。

为验证家蚕 Orco 抗体的特异性，进行了 Western blot 分析，结果表明，Orco 抗体能够特异性检测到原核表达的家蚕 Orco 蛋白和家蚕组织表达的 Orco 蛋白(图 5)。

为验证 Orco 抗体的组织特异性，我们对家蚕 1 龄幼虫触角进行了抗体染色，发现 Orco 蛋白在家蚕 1 龄幼虫触角中有特异表达(图 6)。

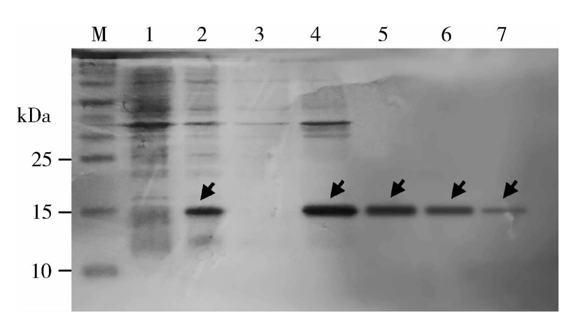


图 3 Orco 蛋白的原核表达与纯化

Fig. 3 Prokaryotic expression and purification of Orco protein

M: 标准分子质量蛋白 Protein molecular weight marker; 1: 未经 IPTG 诱导的转化重组 pET-28a(+)-*Orco* 的 BL21 菌株的表达产物 Expression product of pET-28a(+)-*Orco* without induction by IPTG; 2: 经 IPTG 诱导的转化重组 pET-28a(+)-*Orco* 的 BL21 菌株的表达产物 Expression product of pET-28a(+)-*Orco* induced by IPTG; 3: 超声破碎后的上清 Supernatant after ultrasonication; 4: 超声破碎后的沉淀 Precipitation after ultrasonication; 5-7: 纯化后目的蛋白 Purified protein.

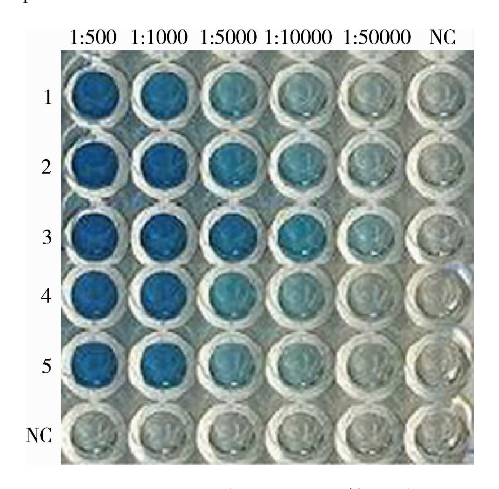


图 4 ELISA 法检测 Orco 抗体的效价

Fig. 4 Orco antibody titer detected by ELISA assay

1-5: 小鼠编号 Mouse no.; 1:500-1:5 000: 血清稀释倍数 Serum dilution ratio; NC: 阴性对照(含 5% 脱脂奶粉的 PBS 缓冲液) Negative control (PBS buffer containing 5% skim milk).

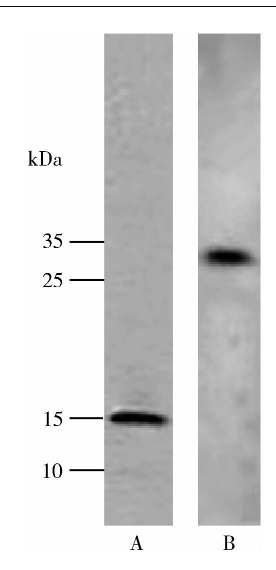


图 5 大肠杆菌中表达的家蚕 Orco(A)及家蚕 3 龄第 1 天幼虫头部总蛋白(B)的 Western blot 结果

Fig. 5 Western blot result of Orco protein of *Bombyx mori* expressed and purified from *Escherichia coli* (A) and the total protein from the head of the 3rd instar day-1 larvae of *B. mori* (B)

3 讨论

目前基因的表达系统主要分为真核表达系统和原核表达系统。真核表达系统具有翻译后修饰功能,表达的蛋白更接近天然状态,适用于一些依赖高级结构的蛋白功能的研究,但做真核表达通常周期比较长、成本比较高。原核细胞表达系统具有成本低,周期短,操作简便以及高效表达等优势,成为外源基因表达的首选系统,但原核表达系统不能对其表达产物进行相关修饰,表达产物无生物活性或生物活性较低。由于本研究的主要目的是制备具有免



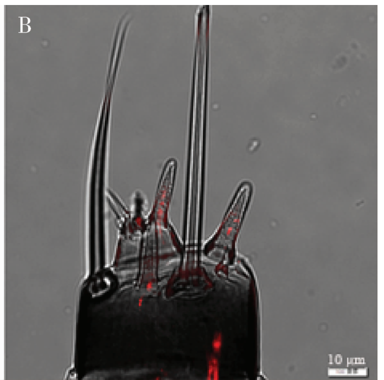


图 6 Orco 蛋白在家蚕 1 龄幼虫触角中的定位

Fig. 6 Localization of the Orco protein in the antenna of the 1st instar larvae of *Bombyx mori*

A: 荧光共聚焦触角图像 Fluorescence confocal antenna image; B: 透射光与荧光共聚焦触角图像的叠合 Merge of transmitted-light antenna image and fluorescence confocal antenna image.

疫原性的蛋白，不需要表达后的修饰、加工，故选用原核表达系统中最常用的大肠杆菌表达系统。

Orco 是多跨膜蛋白，有 7 个跨膜区，进行原核表达时应避免选择跨膜区（利用 *Orco* 基因的整个编码区虽然能成功构建原核表达载体，但无目的蛋白表达）。我们参照 Pitts 等（2004）合成人工多肽制备冈比亚按蚊 Orco 抗体所选取的氨基酸片段，设计引物，克隆了位于第 4 – 5 跨膜区之间的片段（第 4 – 5 跨膜区之间的非跨膜区是整个编码区非跨膜区中最长的一段），以此片段与原核表达载体连接构建重组表达载体，成功诱导表达出了与预测蛋白大小一致的目的蛋白，我们已用该蛋白为抗原制备了特异性非常好的抗体，目前正应用于家蚕 Orco 蛋白组织定位的研究中。该研究思路不仅可为其他昆虫 Orco 的原核表达提供参照，对其他多跨膜蛋白的原核表达也有借鉴意义。

RNA 水平上表达模式的研究发现，不同昆虫中，*Orco* 基因的表达谱存在差异，有的昆虫仅在触角中特异性表达（陈茜等，2011；Dong *et al.*，2012），有的仅在触角和下颚须中表达（Larsson *et al.*，2004），有的除了在主要嗅觉器官触角和下颚须中表达外，还在胸部或腹部、足、喙、生殖器、肠道等部位表达（Krieger *et al.*，2002；Melo *et al.*，2004；Pitts *et al.*，2004；Xia and Zwiebel，2006；Lu *et al.*，2009；申建梅等，2011；张逸凡等，2011；Wang *et al.*，2012；Olafson，2013；赵海明等，2013；Hansen *et al.*，2014）。而目前有关 Orco 蛋白组织定位的研究仅限于少数昆虫头部器官如触角、下颚、口器（Larsson *et al.*，2004；Melo *et al.*，2004；Pitts *et al.*，2004，2014；Benton *et al.*，2006；Xia and Zwiebel，2006；张林雅等，2012；Olafson，2013；Hansen *et al.*，2014）及非嗅觉组织精巢和精子（Hansen *et al.*，2014；Pitts *et al.*，2014）。为全面了解 Orco 的功能，还需加强 Orco 蛋白组织定位的研究。

参考文献（References）

Benton R, Sachse S, Michnick SW, Vosshall LB, 2006. Atypical membrane topology and heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors *in vivo*. *PLoS Biol.*, 4(2): 240 – 257.

Benton R, Vannice KS, Gomez-Diaz C, Vosshall LB, 2009. Variant ionotropic glutamate receptors as chemosensory receptors in *Drosophila*. *Cell*, 136: 149 – 162.

Chen X, Wu ZN, Du YJ, Zhuge QC, 2011. Expression profiling of olfactory receptor gene in the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 54(8): 881 – 886. [陈茜，吴仲南，杜永均，诸葛启钏，2011. 斜纹夜蛾嗅觉受体基因Ⅲ的表达谱分析. 昆虫学报，54(8)：881 – 886]

Clyne PJ, Warr CG, Freeman MR, Lessing D, Kim J, Carlson JR, 1999. A novel family of divergent seven-transmembrane proteins: candidate odorant receptors in *Drosophila*. *Neuron*, 22(2): 327 – 338.

Dobritsa AA, van der Goes van Naters W, Warr CG, Steinbrecht RA, Carlson JR, 2003. Integrating the molecular and cellular basis of odor coding in the *Drosophila* antenna. *Neuron*, 37: 827 – 841.

Dong X, Zhong G, Hu M, Yi X, Zhao H, Wang H, 2012. Molecular cloning and functional identification of an insect odorant receptor gene in *Spodoptera litura* (F.) for the botanical insecticide rhodojaponin III. *J. Insect Physiol.*, 59(1): 26 – 32.

Elmore T, Ignell R, Carlson JR, Smith DP, 2003. Targeted mutation of a *Drosophila* odor receptor defines receptor requirement in a novel class of sensillum. *J. Neurosci.*, 23: 9906 – 9912.

Engsontia P, Sanderson AP, Cobb M, Walden KKO, Robertson HM, Brown S, 2008. The red flour beetle's large nose: an expanded odorant receptor gene family in *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38(4): 387 – 397.

Hansen IA, Rodriguez SD, Drake LL, Price DP, Blakely BN, Hammond JI, Tsujimoto H, Monroy EY, Maio WA, Romero A, 2014. The odorant receptor co-receptor from the bed bug, *Cimex lectularius* L. *PLoS ONE*, 9(11): e113692.

Hill CA, Fox AN, Pitts RJ, Kent LB, Tan PL, Chrystal MA, Cravchik A, Collins FH, Robertson HM, Zwiebel LJ, 2002. G protein-coupled receptors in *Anopheles gambiae*. *Science*, 298: 176 – 178.

Jones WD, Nguyen TAT, Kloss B, Lee KJ, Vosshall LB, 2005. Functional conservation of an insect odorant receptor gene across 250 million years of evolution. *Curr. Biol.*, 15: 119 – 121.

Krieger J, Klink O, Mohl C, Raming K, Breer H, 2003. A candidate olfactory receptor subtype highly conserved across different insect orders. *J. Comp. Physiol. A*, 189: 519 – 526.

Krieger JKO, Raming K, Dewer YME, Bette S, Conzelmann S, Breer H, 2002. A divergent gene family encoding candidate olfactory receptors of the moth *Heliothis virescens*. *Eur. J. Neurosci.*, 16: 619 – 628.

Larsson MC, Domingos AI, Jones WD, Chiappe ME, Amrein H, Vosshall LB, 2004. *Or83b* encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron*, 43: 703 – 714.

Liu C, Pitts RJ, Bohbot JD, Jones PL, Wang G, Zwiebel LJ, 2010. Distinct olfactory signaling mechanisms in the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS Biol.*, 8(8): e1000467.

Lu B, Wang N, Xiao J, Xu Y, Murphy RW, Huang D, 2009. Expression and evolutionary divergence of the non-conventional olfactory receptor in four species of fig wasp associated with one species of fig. *BMC Evol. Biol.*, 9: 43.

Melo ACA, Rützler M, Pitts RJ, Zwiebel LJ, 2004. Identification of a chemosensory receptor from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, that is highly conserved and expressed in olfactory and gustatory organs. *Chem. Senses*, 29(5): 403 – 410.

Nakagawa T, Sakurai T, Nishioka T, Touhara K, 2005. Insect sex-pheromone signals mediated by specific combinations of olfactory

receptors. *Science*, 307: 1638 – 1642.

Neuhaus EM, Gisselmann G, Zhang W, Dooley R, Stortkuhl K, Hatt H, 2005. Odorant receptor heterodimerization in the olfactory system of *Drosophila melanogaster*. *Nat. Neurosci.*, 8(1): 15 – 17.

Ng M, Roorda RD, Lima SQ, Zemelman BV, Morcillo P, Miesenbock G, 2002. Transmission of olfactory information between three populations of neurons in the antennal lobe of the fly. *Neuron*, 36: 463 – 474.

Olafson PU, 2013. Molecular characterization and immunolocalization of the olfactory co-receptor Orco from two blood-feeding muscid flies, the stable fly (*Stomoxys calcitrans*, L.) and the horn fly (*Haematobia irritans irritans*, L.). *Insect Mol. Biol.*, 22(2): 131 – 142.

Patch HM, Velarde RA, Walden KKO, Robertson HM, 2009. A candidate pheromone receptor and two odorant receptors of the hawkmoth *Manduca sexta*. *Chem. Senses*, 34: 305 – 316.

Pitts RJ, Fox AN, Zwiebel LJ, 2004. A highly conserved candidate chemoreceptor expressed in both olfactory and gustatory tissues in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(14): 5058 – 5063.

Pitts RJ, Liu C, Zhou X, Malpartida JC, Zwiebel LJ, 2014. Odorant receptor-mediated sperm activation in disease vector mosquitoes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111(7): 2566 – 2571.

Rytz R, Croset V, Benton R, 2013. Ionotropic receptors (IRs): chemosensory ionotropic glutamate receptors in *Drosophila* and beyond. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 43(9): 888 – 897.

Sakurai T, Nakagawa T, Mitsuno H, Mori H, Endo Y, Tanoue S, Yasukochi Y, Touhara K, Nishioka T, 2004. Identification and functional characterization of a sex pheromone receptor in the silkmoth *Bombyx mori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(47): 16653 – 16658.

Shen JM, Hu LM, Bin SY, Lin JT, 2011. Cloning and expression profiling of an olfactory receptor gene in *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae). *Acta Entomologica Sinica*, 54(3): 265 – 271. [申建梅, 胡黎明, 宾淑英, 林进添, 2011. 瓜实蝇嗅觉受体基因的克隆及表达谱分析. 昆虫学报, 54(3): 265 – 271]

Vosshall LB, Amrein H, Morozov PS, Rzhetsky A, Axel R, 1999. A spatial map of olfactory receptor expression in the *Drosophila* antenna. *Cell*, 96: 725 – 736.

Vosshall LB, Wong AM, Axel R, 2000. An olfactory sensory map in the fly brain. *Cell*, 102: 147 – 159.

Wang X, Zhong M, Wen J, Cai J, Jiang H, Liu Y, Aly SM, Xiong F, 2012. Molecular characterization and expression pattern of an odorant receptor from the myiasis-causing blowfly, *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Parasitol. Res.*, 110: 843 – 851.

Xia Y, Zwiebel LJ, 2006. Identification and characterization of an odorant receptor from the West Nile virus mosquito, *Culex quinquefasciatus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 36(3): 169 – 176.

Xu X, Liu ZY, Cui HB, Yang Y, Guo XQ, Zhang T, Liu QX, Cui WZ, 2014. Prokaryotic expression and purification of bombyxin-II in the silkworm (*Bombyx mori*). *Acta Entomologica Sinica*, 57(1): 8 – 12. [徐欣, 刘朝阳, 崔海波, 杨洋, 郭晓琪, 张涛, 刘庆信, 崔为正, 2014. 家蚕素Ⅱ基因原核表达及蛋白纯化. 昆虫学报, 57(1): 8 – 12]

Yu Q, Li XT, Liu C, Cui WZ, Mu ZM, Zhao X, Liu QX, 2014. Evolutionarily conserved repulsive guidance role of slit in the silkworm *Bombyx mori*. *PLoS ONE*, 9(10): e109377.

Zhang LY, Xie BH, Ni CX, Zhao L, Li HL, Shang HW, 2012. Cloning, expression and subcellular localization of the olfactory co-receptor Orco gene in the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae). *Acta Entomologica Sinica*, 55(11): 1246 – 1254. [张林雅, 谢冰花, 倪翠侠, 赵磊, 李红亮, 商晗武, 2012. 中华蜜蜂 Orco 嗅觉受体基因的克隆、表达及亚细胞定位. 昆虫学报, 55(11): 1246 – 1254]

Zhang YF, Xiu WM, Yang DL, Dong SL, Liu YS, 2011. Tissue-specific expression and temporal and spatial expression of atypical odorant receptor gene *OR2* in *Spodoptera exigua* (Hübner). *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 27(7): 231 – 235. [张逸凡, 修伟明, 杨殿林, 董双林, 刘玉升, 2011. 甜菜夜蛾非典型嗅觉受体基因 *OR2* 的组织特异性和时空表达. 中国农学通报, 27(7): 231 – 235]

Zhao HM, Yi X, Hu MY, An GD, Wang HD, Huang L, 2013. Cloning and expression of atypical odorant receptor gene *Orco* in *Bactrocera dorsalis*. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 32(1): 40 – 47. [赵海明, 易欣, 胡美英, 安国栋, 王会冬, 黄林, 2013. 桔小实蝇非典型气味受体 Orco 基因的克隆与表达谱分析. 华中农业大学学报, 32(1): 40 – 47]

Zhao YY, Liu F, Yang G, You MS, 2011. PsOr1, a potential target for RNA interference-based pest management. *Insect Molecular Biology*, 20(1): 97 – 104.

Zhou YL, Zhu XQ, Gu SH, Cui HH, Guo YY, Zhou JJ, Zhang YJ, 2014. Silencing in *Apolygus lucorum* of the olfactory coreceptor Orco gene by RNA interference induces EAG response declining to two putative semiochemicals. *J. Insect Physiol.*, 60: 31 – 39.

(责任编辑: 袁德成)